Aus der Universitätsfrauenklinik Hamburg-Eppendorf
Direktor der Klinik: Prof.Dr.med. G. S c h u b e r t

Histologisch-histochemische Untersuchungen an der Grundsubstanz von Bindegewebskapseln und Tumoren um Strontium-90 Implantationen.

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Carl R e i n e c k e
aus B r a k e an der Unterwweser

H a m b u r g 1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 2.9.1961.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Dekan: Professor Dr. Prévôt/ Prof. Dr. Ma.

Referent: Privatdozent Dr. med. G. Uhlmann

Korreferent: Prof. Dr. Schubert

Dem Direktor der Universitäts-Frauenklinik Hamburg-Eppendorf, Herrn Prof. Dr. G. Schubert, danke ich ergebenst für die Erlaubnis, in der Forschungsabteilung der Frauenklinik arbeiten zu dürfen.

Dem Privatdozenten Herrn Dr. med. G. Uhlmann bin ich für die Stellung des Materials und die freundliche Unterstützung besonders dankbar.

I N H A L T

	Seite:
A) EINFÜHRUNG	
1) Strahleneinfluß - Strahlenwirkung	1 - 6
2) Die Erzeugung von Strahlentumoren im Tierversuch	7 - 12
B) VERSUCHSANORDNUNG	
1) Material	13 - 15
2) Methodik	15 - 18
C) ERGEBNISSE	
1) Histologische Einordnung	19 - 23
2) TUMOREN	
a) Carcinome	24 - 25
b) Sarkome	25 - 26
3) Histochemische Beobachtungen	26 - 28
D) DISKUSSION	29 - 31
E) ZUSAMMENFASSUNG	32 - 33
F) LITERATURANGABEN	34 - 35

A) EINFÜHRUNG

1) Strahleneinfluß - Strahlenwirkung

Seit Entstehen jeglichen Lebens auf der Erde besteht auch die Tatsache einer, wenn auch geringen Strahlenbelastung. Sie ist durch die sogenannte Höhenstrahlung einmal, zum andern aus der umgebenden Materie und zum dritten aus natürlichen in den Körper eingelagerten radioaktiven Elementen gegeben. Diese drei Faktoren werden zur natürlichen Strahlung zusammengefaßt.

Zu diesem natürlichen Strahlenuntergrund("background") trat dann erstmals durch die Entdeckung der Röntgenstrahlen im Jahre 1895 und ihrer Verwendung in der Medizin für den Menschen eine weitere Strahlenbelastung hinzu. An den biologischen Auswirkungen der Röntgenstrahlen hat man zuerst die medizinische Bedeutung einer Strahlenwirkung erkennen können. In der Pionierzeit der Röntgenheilkunde sind auf diese Weise eine Reihe der führenden Röntgenologen der Einwirkung der Röntgenstrahlen infolge multipler Hautcarcinome zum Opfer gefallen.(Albers-Schönberg!)

Die Fortschritte der Physik brachten dann mit der Entdeckung der Kernspaltung durch HAHN und MEITNER im Jahre 1939 eine neue und wesentlich gravierende zusätzliche Strahlenbelastung.

Bei der Explosion von Atombomben wie auch bei Reaktionen, die im Reaktor ablaufen, ist wesentlich, daß neben der Energieabgabe eine große Menge von Spaltprodukten, das heißt Kerne niedriger Ordnungszahl, entstehen, von denen die meisten radioaktiv sind.

Dieser sogenannte "Debris" - das ist der Sammelbegriff für den bei der Explosion oder auch nach einer nuklearen Katastrophe entstehenden radioaktiven Staub - führt einmal zu dem lokalen "Fallout", zum zweiten zum troposphärischen und zum dritten dem stratosphärischen Fallout.

Der lokale Fallout wird einige Stunden in der nahen Um-

gebung der Reaktion eingelagert und kann durch seine hohe Strahlenintensität verhängnisvoll wirken.
Als Beispiel sei verwiesen auf die Schädigung japanischer Fischer im Jahre 1954.
Die Besonderheit der Probleme für den Menschen im Hinblick auf diese zusätzliche Strahlenbelastung durch den Fallout liegt darin, daß sie für jeden von uns unvermeidlich ist. Bei der Schädigung durch Röntgenstrahlen sind immer nur Einzelindividuen betroffen.
Bei der Zusammensetzung des Spaltproduktgemisches spielen die langlebigen - i.e. lange Halbwertszeit - Nuklide die Hauptrolle. Unter ihnen ist das Strontium-90, mit seinem Tochterelement Yttrium-90 für den Menschen das gefährlichste Element, da es in den Knochen eingelagert nur sehr langsam ausgeschieden wird. Es ist ein ß-Strahler mit einer physikalischen Halbwertszeit von 28 Jahren. Etwa 60 bis 70% des im Fallout enthaltenen Radiostrontiums liegen zudem in wasserlöslicher Form vor.
Man bezieht die Messwerte für das Strontium^{90} stets auf das Calcium, da es wegen seiner chemischen Verwandtschaft mit diesem Element wandert.
Durch die große Zahl der Kernwaffenversuche kam es zu einem ständigen Ansteigen der Kontamination durch Radiostrontium.
So enthielt beispielsweise 1960 der Hafer in Schleswig-Holstein 171 Mikromikrocurie Sr^{90}/g Ca. Der mittlere Verseuchungsgrad in der Gesamtnahrung beträgt in Deutschland etwa 13 Strontiumeinheiten (13 x 10^{-12} C/g Ca).
Das Strontium wird hauptsächlich in den Knochen eingelagert, da es mit dem Ca wandert. Eine besondere Belastung trifft wegen des höheren Calziumaustausches die Jugendlichen. Bei ihnen wurde ein Durchschnittswert von 1,9 Strontiumeinheiten gefunden. Man spricht hierbei von der sogenannten biologischen Halbwertszeit. Sie ergibt sich aus der besonderen

Berücksichtigung von physikalischer Halbwertszeit und der Ausscheidung durch den Stoffwechsel.
Sie beträgt etwa 7,5 Jahre, das heißt nach 7,5 Jahren ist noch die Hälfte des eingelagerten Sr^{90} im menschlichen Knochen vorhanden.
Die Gefahr wird besonders deutlich, wenn man hört, daß es gelungen ist, die angewachsene Radioaktivität in Nordengland im Hirschgeweih durch Autographie darzustellen.
Da man heute in Abschätzung des biologischen Risikos zu der Auffassung gekommen ist, daß es für eine inkorporierte radioaktive Substanz überhaupt keine Toleranzdosis gibt, erwachsen aus den genannten Messungen große Probleme.
Das Verhalten der biologisch wirksamen Radionuklide in der Biosphäre und im Organismus bedarf weiterer eingehender Erforschung, nicht zuletzt gerade auch im Hinblick auf die friedliche Verwendung der Atomenergie. -
Das Strahlencarcinom, wie auch das osteogene Strahlensarkom ist eine außerordentlich seltene Krankheit(HUG und FEINE). In der Pionierzeit der Strahlentherapie erkrankte als erster ein Röntgentechniker, der nach einer Latenzzeit von 7 Jahren ein Röntgencarcinom am Handrücken bekam.(K!H. BAUER)
Die Bezeichnung "RÖNTGEN ⊥ KARZINOM" wurde von HESSE 1911 geprägt und eingeführt, der über 93 Fälle berichten konnte.
Man stellte bald fest, daß nicht nur Röntgenstrahlen kanzerogen wirken, sondern auch jegliche andere ionisierende Strahlung(Strahlung von Radium, von künstlichen radioaktiven Isotopen, Thorium X usw.)
Nach ihre Lokalisation treten die Strahlencarcinome meist auf der äußeren Haut im Bereich von strahlenverändertem Gewebe auf.(K.H. BAUER) Sie können sich jedoch auch an inneren Organen entwickeln, was lange Zeit umstritten war.
Unter den für die Entwicklung von Strahlencarcinomen verantwortlichen Noxen wird häufig auf das Kontrastmittel

Thorotrast hingewiesen. Oft blieben Teile des Kontrastmittels am Orte der Einbringung liegen und verursachten Strahlenschäden, nicht selten bösartige Tumoren(HOFER, MATZKER und Mitarbeiter).

Die Frage der ENTSTEHUNG des Strahlencarcinoms ist bisher noch nicht eindeutig geklärt worden. Die zur Zeit herrschende Auffassung sei wegen späterer Erörterungen kurz angeführt:

Einflüsse ionisierender Strahlen können durch Aufhebung der Teilungsfähigkeit oder durch Auslösen von Erschöpfungszellteilungen die Lebensdauer eines Gewebsbezirkes verkürzen; das führt aber nicht zu direkten Nekrosen, sondern nur zur Atrophie bestrahlter Gewebsbezirke. Demgegenüber steht die direkte nekrotisierende Wirkung.

Während die eigentliche Strahlenwirkung, der Ionisierungseffekt, unsichtbar bleibt, werden hierdurch ausgelöste Veränderungen morphologisch deutlich. Sie treten in Abhängigkeit vom Zeitfaktor - bei welchem die Zustandsänderung des Objektes schon während der Bestrahlungszeit die Vorgänge beeinflussen kann - und in Abhängigkeit von der unterschiedlichen entweder dauernden oder temporären Strahlenempfindlichkeit von Zellen und Geweben auf.

Ionisierende Strahlen greifen in erster Linie am Zellkern an (LANGENDORFF 1949)!

Als eindrucksvollen, wenn auch ungewöhnlichen mechanischen Effekt, der wohl in seiner Bedeutung nicht auf menschliches Gewebe übertragen werden kann, konnte GÄRTNER bei Elektronenstrahlen das direkte Herausschießen von Zellkernen(Ruhekernen) in lebenden Zellkulturen beobachten, wo Kerne nach der Bestrahlung eruptionsartig ausgestoßen wurden.

Unter gewöhnlichen Bedingungen machen sich Veränderungen im Sinne von Zusammenballungen und Klumpenbildungen der Chromatinsubstanz des Zellkerns, Chromomerenversprengung

und Chromatolyse, aber auch Körnelungen im Cytoplasma bemerkbar. Es kann zusätzliche Vakuolenbildung im Kern und Cytoplasma, bei Wirkung schneller Elektronen auch Kernvergrößerung und blasige Auftreibung des Nukleolus, mitunter Ausscheidung von Chromatinsubstanz ins Cytoplasma beobachtet werden (HOMANN und HOFMANN 1950).
Die Befunde bei tödlichem Strahleneffekt sprechen im Ganzen für eine Koagulationswirkung und führen bei ihrer weiteren Entwicklung meist zum Bilde der Kernpyknose und Koagulationsnekrose.
Chemisch scheint durch Bestrahlung die Nukleinsäureproduktion gehemmt zu werden.
Neben der direkten Wirkung durch energiereiche Strahlen auf reagierende Substrate in Zellen und Geweben im Sinne der "TREFFERTHEORIE" erscheint es gewiß, daß die ionisierenden Strahlen auch indirekt über bestimmte Reaktionsmechanismen wirken, welche durch die Strahlenenergie erst in der Zelle ausgelöst werden (LANGENDORFF 1950).
Eine Trefferwirkung tritt jedoch erst in Erscheinung, wenn Steuerungszentren der Zellfunktion getroffen werden. Im allgemeinen kann jeweils nur ein Bruchteil aller in der Zelle vorhandener Moleküle zufallsmäßig getroffen werden. (G. SCHUBERT)
Zunächst entstehen Bestrahlungszwischenprodukte, die auf Sulfhydrylgruppen und damit auf Enzyme einzuwirken vermögen. Durch Fermenthemmung könnte das Absinken des Thymonukleinsäuregehaltes, ferner das Ausbleiben der Polymerisation der Desoxyribonukleotide und damit die Verklumpungsneigung der Chromosomen erklärt werden.
Vor allem in jugendlichen Zellen können bei der dort herrschenden besonderen Reaktionsgeschwindigkeit sonst reversible Veränderungen zur Fehlsteuerung biologischer Vorgänge und zum Zelluntergang führen.
Auch bei der Krebsentstehung ist es durchaus denkbar, daß

die auslösenden ersten Ereignisse Elementarprozesse im Sinne der Mikrophysik sind. (G.SCHUBERT)

Nach Untersuchungen von RAJEWSKI(1949) ist es noch nicht entschieden, ob Radium-, Röntgen- und Ultravioletts trahlen eine direkt kreberzeugende Wirkung auf die Zellen ausüben, oder aber erst indirekt über krebserzeugende Substanzen, die sich in den bestrahlten Zellen bilden, wirksam werden. Wesentlich ist für die Wirkung der Strahlen deren Irre - versibilität, die gleiche Irreversibilität, welche TEUTSCH-LÄNDER(1934) und H.v. EULER(1942) für die der kanzerogenen Kohlenwasserstoffe fanden.

Eine theoretische Deutung der Abwandlung der Zellen unter dem Einfluß kanzerogener Reize versuchen IVERSEN und ARLEY (1950) zu geben. Danach sollte die Geschwulstbildung angesehen werden als eine Funktion des induzierten Anstieges der Proliferationsrate der Zellen - oder ausgedrückt in Analogie zu den Energiestufen von Atomen - als eine sichtbare Manifestation einer geänderten Proliferationsrate zur Zeit der Applikation eines Agens.

2) Die Erzeugung von Tumoren im Tierversuch

MARIE und CLUNET gelang es im Jahre 1910 bzw. 1912, über eine Radiumdermatitis bei zwei Ratten transplantable Spindelzellsarkome zu provozieren.
DAELS(1926) implantierte Ratten Glasröhrchen unter die Haut, die in Wasser gelöstes Radiumbromid enthielten. Nach sieben Monaten entstand bei einer von zehn so behandelten Ratten ein Sarkom. In späteren Versuchen gelang es DAELS und BILTUIS durch subkutane Applikation eines Röhrchens mit wenigen Tropfen einer Lösung, die auf 100 ccm 10 mg Radiumbromid enthielt, bei der weißen Maus einen verhornenden Plattenepithelkrebs zu erzeugen.
SCHÜRCH und UEHLINGER (1931) sahen nach subperiostaler Applikation von 1 mg Radium am Kiefer eines Kaninchens Sarkomentstehung. Das Radium hatte 20 Tage lang eingewirkt; der Tumor trat 1,5 Jahre nach der Bestrahlung auf. In einem weiteren Versuch brachten SCHÜRCH und UEHLINGER (1934) Vaseline in eine eingemeißelte Stelle eines Kaninchentrochanter, die Spuren von Radium oder Mesothorium enthielt. In einem Fall beobachteten sie 19 Monate nach Applikation von 3 mg Mesothorium am Oberschenkel ein Osteosarkom. Bei der Sektion, 21 Monate nach der Mesothoriumapplikation, fanden sie zahlreiche Metastasen in Lunge, Leber und Milz. 1935 berichteten dieselben Forscher, daß bei Kaninchen, bei denen die radioaktive Substanz in den Oberschenkel eingebracht worden war, sich Knochensarkome entwickelt hatten, die auffallende Ähnlichkeit mit den beim Menschen beobachteten Knochensarkomen darboten und auch in ähnlicher Weise metastasierten.
Den experimentellen Beweis für die krebserzeugende Wirkung der Radiumemanation haben HUECK(1937) sowie RAJEWSKI, SCHRAUB und KAHLAU (1943) erbracht.

Im Krebsinstitut der Universität Löwen haben A. WAMBERSIE, J.MAISIN, J.M.BRUCHER und R.CONSTANT an 50 Kaninchen die Läsionen untersucht, die durch intercerebrale Implantationen von Iridium^{194}-Kügelchen hervorgerufen werden. Dieses Isotop wurde wegen derstarken ß=Emission gewählt. Das Iridium ist ein Metall, was sehr leicht aktiviert werden kann. Das Isotop besteht zu 70% aus einer Strahlung, die im Energiemaximum 2,24 Mev. beträgt.

Bei den Tieren, die einige Tage nach der Implantation getötet wurden, zeigten die Läsionen drei verschiedene Zonen:
a) eine Zone der Nekrose oder totalen Zelldestruktion derjenigen Zellen, die in unmittelbarer Nähe des Kügelchens waren;
b) eine ringförmige Übergangszone mit Vorherrschen der vaskulären Läsionen. Dabei finden sich einige Thrombosen und zahlreiche perikapilläre Blutungen. Man sieht dagegen keine massive Hämorrhagie;
c) außerhalb dieser Übergangszone zeigt das Nervengewebe wenig Veränderungen.
Am 30. Tag ist das Kügelchen von einem fibrösen Stroma umgeben und schwimmt in einem eingeschmolzenen und nekrotisierten Gewebe. Dieses wird von einer schmalen Übergangszone begrenzt, die eine erhebliche gliale Reaktion und eine Proliferation von kleinen verhärteten Gefäßen aufweist. Daran anschließend erscheint das Nervengewebe nahezu normal. Die Grenze zwischen gesundem Gewebe und den Läsionen ist besonders scharf.
Die Dimensionen der durch Iridium^{194} hervorgerufenen Radionekrosen erreichten etwa um den 10. Tag mit einem Durchmesser von 5,6 und 7 mm das Maximum. Die Kügelchen hatten eine Aktivität von 1.3 und 5 mC. -

Vor der Anwendung von Thorotrast beim Menschen hat K.H. Bauer gewarnt; der experimentelle Beweis für die Tumor-

entstehung durch Thorotrast haben Roussy, Oberling und Guérin(1936) sowie Selbie(1936) geliefert. Es erwies sich bald, daß die im Tierversuch erworbenen Kenntnisse ihre volle Berechtigung hatten, als nämlich bei der Anwendung von radioaktivem Phosphor zu diagnostischen Zwecken beim Menschen Tumorentstehung beobachtet wurde.

Durch Röntgenbestrahlung war es MARIE und CLUNET(1910) unter anderem gelungen, ein polymorphzelliges, aber nicht transplantables Sarkom auf dem Boden einer Röntgendermatitis bei der weißen Maus zu erzeugen. Später provozierten sie einen durch vier Generationen transplantablen Tumor.
BLOCH gelang 1924 die experimentelle Erzeugung eines Carcinoms durch Röntgenstrahlen, später auch SCHÜRCH(1931). Zunächst zeigten sich am bestrahlten Ohr Pigmentzunahme, dann wurden die Haare weiß und fielen etwa vier Monate nach Beginn der Bestrahlung aus. Es folgten atrophische Prozesse, Depigmentation, Gefäßdilatation und verruköse Hyperkeratosen. Mit der Perforation - in einem Fall neun Monate nach Abschluß der über dreizehn Monate verteilten Bestrahlung - trat ein Plattenepithelcarcinom auf, das schließlich zur Zerstörung des ganzen Ohres und zum Exitus durch Lungenmetastasen führte.
Durch Röntgenstrahlen sind bei Maus, Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen Geschwülste zu erzeugen, und zwar sowohl Sarkome als auch Carcinome. Mit Teer gelingt die Carcinomerzeugung bekanntlich schwer oder garnicht. Die Krebsentstehung am Kaninchenohr nach Röntgenbestrahlung verläuft sehr ähnlich, in beiden Fällen über die Entstehung zunächst gutartiger Papillome.
LÜDIN(1930) erzeugte mit Röntgenstrahlen an der Kaninchentibia ein Chondrosarkom. 1923 stellte Domagk fest, daß bei Mäusen, die unmittelbar vor der Teerung einer Röntgenbestrahlung ausgesetzt worden waren, in einem viel größeren

Prozentsatz Carcinome zur Entwicklung kamen, als bei nur geteerten Tieren.
LACASSAGNE(1929) konnte durch Bestrahlung von Abscessen am Oberschenkel bei Kaninchen Sarkome mit infiltrierendem Wachstum hervorrufen. Auch Metastasen wurden beobachtet. Histologisch handelte es sich um verschiedenartige Sarkome: Spindelzellsarkome, Osteosarkome, Myxosarkome und Rhabdomyosarkome. Die Latenz zwischen Bestrahlung und Auftreten der Tumoren schwankte zwischen sechs Monaten und drei Jahren. Bemerkenswert ist, daß schwache Röntgenstrahlen, die an sich die Abscesse günstig beeinflußt hatten, imstande waren, die Tumoren hervorzurufen.
1928 hatte FINDLAY gezeigt, daß bei geteerten Mäusen, die mit UV-Licht bestrahlt wurden, die Carcinome viel schneller auftreten und wachsen als bei nicht bestrahlten Tieren. Auch sah er Carcinome bei Tieren auftreten, die nur mit UV-licht bestrahlt wurden.
1931 berichteten PUTSCHAR und auch HOLTE ausführlich über die Entstehung von Hautkrebsen bei Ratten nach langdauernden UV-Bestrahlungen. WAHLGREN kam (1934) zu einem ähnlichen Ergebnis. Die Geschwülste entstanden vornehmlich an unbehaarten Stellen wie an den Ohren und am Schwanz. HUDSCHINSKY rief durch abnorm lange UV-Bestrahlungen Augensarkome bei Ratten hervor. Er war der Ansicht, daß die kurzwelligen UV-Strahlen unter 270 µ besonders geschwulsterzeugend wirken. ROFFO und BÜNGELER (1930 + 1937) konnten selbst durch intensive Sonnenbestrahlung Geschwülste erzeugen.

Aus diesen Beobachtungen ersehen wir mit Sicherheit, daß die künstliche Krebserzeugung mit sehr verschiedenartigen Strahlen möglich ist. Man ist geneigt, von einer Tumorerzeugung durch physikalische Einflüsse zu sprechen.
Der tierische wie auch der menschliche Körper hat nur die

Fähigkeit, auf viele verschiedenartige Reize in ähnlicher Weise zu antworten, auf eine große Reihe von Faktoren mit akuter oder chronischer Entzündung, auf andere mit Tumorbildung verschiedener Art.
Ob und welche Tumoren entstehen, hängt dabei wesentlich vom "Mutterboden" ab. Dieses allgemein gültige Prinzip ist durch die experimentelle Geschwulstforschung der letzten Jahre immer wieder bestätigt worden.
Mit großer Wahrscheinlichkeit brauchen es garkeine Veränderungen der Zelle zu sein, die allein durch Zufuhr krebserzeugender chemischer Substanzen hervorgerufen werden, offenbar genügen schon physikalische Schädigungen der Zelle, vielleicht sogar schon der Entzug bestimmter Cytoplasmabestandteile oder Fermente, die bei Zufuhr cancerogener Substanzen von außen vernichtet oder wenigstens stark vermindert beziehungsweise geschädigt werden.
Aus vielen Beobachtungen resultiert, daß die krebserzeugende oder krebsauslösende Substanz nicht in jedem Fall zum Krebs führt, sondern nur, wenn sie auf geeignete Zellen trifft, in denen dann Veränderungen am Kern und am Cytoplasma eintreten, die die Krebszellen vor anderen Zellen auszeichnen.

Wenn wir im Tierversuch cancerogene Stoffe gefunden haben, werden wir dazu neigen, dieselben auch als gefährlich für den menschlichen Organismus anzusehen.
Es ist nicht sicher, daß es nicht außerdem noch für bestimmte Zellen des menschlichen Organismus spezifisch, tumorerzeugende Substanzen - oder Strahlen gibt, die bei den üblichen Versuchstieren nicht wirksam sind.
Die vorliegende Arbeit knüpft an frühere Untersuchungen an. Es wird versucht, durch histologisch-histochemische Untersuchungen weiteren Einblick in die Veränderungen am Zellkern und am Cytoplasma von Bestrahlungszonen bzw. Strahlentumoren zu gewinnen.

Die Veränderungen an der Faserstruktur wurden bei dem gleichen Material von D. HILWEG untersucht und in einer entsprechenden Dissertation vorgelegt.
Diese Trennung war wegen der Fülle des Materials und der Verschiedenheit der Untersuchungsmethoden vorgenommen worden. -

B) VERSUCHSANORDNUNG

1) Material

Das Material für die vorliegende Arbeit stammt aus früheren Versuchsreihen der Forschungsabteilung der Universitätsfrauenklinik Hamburg-Eppendorf.

Als Implantationsmaterial wurden radioaktive Glasperlen benutzt, die nach einem besonderen Verfahren hergestellt worden waren. Sie enthielten das Radioisotop Strontium^{90}. Es handelt sich dabei um einen reinen ß=Strahler, der bereits in der Einführung Erwägung fand.

Es wurden Perlen mit den Aktivitäten 0,5 /uC, 1,0 /uC, 2,0 /uC verwendet. Zum Vergleich und zur Ergänzung wurden noch Gewebe aus einem älteren Versuch mit wesentlich höheren Intensitäten untersucht.

a) Versuchsanlage

Als Tiermaterial standen Inzuchtratten der Stämme BD I und BD III von Prof. Druckrey, Freiburg/Breisgau, zur Verfügung. Die Perlen wurden in Äthernarkose unter aseptischen Bedingungen unter die Bauchhaut der li Flanke eingepflanzt.

b) Ergebnisse

Bei einer früheren Versuchsserie mit hohen Radioaktivitäten von 30, 45 und 85 /uC und einer kleinen Reihe von schwachen Aktivitäten - 1,5 /uC - hatte sich ergeben, daß die Tumor - häufigkeit bei den schwachen Implantaten überraschend hoch bei 36% lag.(SCHUBERT, KÜNKEL, OVERBECK und UHLMANN)

Die Häufigkeit des Auftretens von Krebsen der Haut und des Unterhautbindegewebes war augenfällig von der Strahlenintensität abhängig. Ebenso war es mit den Latenzzeiten, mit anderen Worten, der Zeitspanne, die zwischen Implantation und erster makroskopischer Tumorentstehung lag.

Besonders auffallend war dabei, daß bei den schwächeren Perlen noch sehr häufig(36%) Krebse hervorgerufen wurden,

ohne daß vorher sichtbare Veränderungen lokal vorgegangen waren.
Diese Beobachtungen gaben Anlass zu dem eingangs erwähnten Versuch. Es sollte untersucht werden, ob diese Tumorrate bei der 1,5 µC-Perle einer weiteren Kontrolle standhielt. Zugleich sollte festgestellt werden, ob sich bei einer geringeren Abstufung der Intensitäten die Tumorhäufigkeit und die Latenzzeit änderten.
Außerdem sollte der Einfluß des Lebensalters der Versuchstiere auf das Ergebnis einer Prüfung unterzogen werden. Zu diesem Zweck wurden die Perlen mit der schwächsten Aktivität(0,5 µC) nur 100 Tage alten Ratten implantiert. Die älteren Ratten mit einem Gewicht von 200 g - die jüngeren wogen nur 100 g - wurden zur Implantation der stärkeren Aktivität herangezogen.
Es standen 151 Tiere zur Verfügung. Bei 58% dieser Ratten trat in unmittelbarer Nähe des Implantats eine Geschwulst auf. Es vergingen im Durchschnitt vom Tag der Einpflanzung bis zum Erscheinen des Tumors 585 Tage.
Bei 54% der Tiere trat als erste sichtbare Strahlenwirkung nach durchschnittlich 374 Tagen eine Alopezie auf.
In 11% der Fälle erschienen nach 579 Tagen chronische, zumeist kleine Strahlenulzera. Bei den meisten dieser Strahlengeschwüre bildeten sich im späteren Verlauf sarkomatöse Tumoren. Bei der früheren Versuchsserie hatten sich überwiegend Carcinome entwickelt.(UHLMANN)

Tabellen

Häufigkeit und Latenzzeit der Tumoren unter ß=Strahlung hoher Intensität.

AKTIVITÄT(µC/Perle)	1,5	30	45	85
TUMORRATE(%)	36	85	83	100
MITTLERE LATENZZEIT(Tage)	389	352	308	270

Krebsentstehung nach kontinuierlicher ß=Bestrahlung niedriger Intensität.

AKTIVITÄT(/uC/Perle)	o,5	1,0	2,0	insgesamt
Implantationsalter(Tage)	100	180	220	——
ZAHL der Versuchstiere	56	54	41	151
ZAHL der Tumoren	28	31	28	87
Tumorrate in %	50	57	68	58

Bei der Sektion wurden die Perlen mit dem sie umgebenden Bindegewebe bzw. Tumor in Formalin für die weitere Untersuchung eingelegt.

2) Methodik:

a) Formalin-Fixation und Einbettungsverfahren:

Wässerung(fließendes Leitungswasser)	48 Std.
Alkohol 70%	12 "
" 80%	12 "
" 96%	12 "
" 100%	12 "
" 100%	12 "
Methylbenzoat	12 "
Benzol I	30 min.
" II	30 "
" III	30 "
Benzolparaffin	2 Std.
Paraffin bei 56° Cels.	12 "
"	12 "

Die Paraffinblöcke wurden bei einer Schnittdicke von 5 - 7 /u in Serie geschnitten. Die Schnitte wurden sodann in warmem Wasser gestreckt und auf mit Eiweissglycerin

vorbehandelte Objektträger gebracht.

FÄRBEMETHODEN:

Gefärbt wurde nach den folgenden 10 Verfahren, und zwar von jedem der Gewebe (40 Blöcke) 10 Serienschnitte je Färbung.

a) Astra-Blau (Basischer Kupferphthalocyaninfarbstoff)

Schnitte entparaffinieren bis aqua dest.

2% Astrablau in 3% Essigsäure(pH_3)	10 Min.
wässern	10 "

aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Eukitt.

Ergebnis: Saure Mucopolysaccharide blau.
Kerne dunkelblau oder dunkelrot.

b) Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS):

Schnitte entparaffinieren bis aqua dest.

0,5 %ige Perjodsäure	5 Min.
in aqua dest. gewissenhaft spülen	
Schiff'sches Reagens	15 "
Metabisulfit I	2 "
" II	2 "
" III	2 "
wässern	3 - 5 "
Haemalaun nach P. Mayer	10 "
wässern	ca 10 "

Lösung Metabisulfit:

Kaliumbisulfit	10 %ig	10,0
n-HCl		10,0
Aqua dest.	ad	200,0

Ergebnis: Polysaccharide, saure und neutrale, Mucopolysaccharide, Muco- und Glycoproteide (Glycolipide, evtl. ungesättigte Lipide und Phosphatlipide)

c) Astra-Blau-Perjodsäure-Schiff-Reaktion:

Entparaffinieren bis aqua dest.
Astra-Färbung und direkt anschließend die PAS-Reaktion.
Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Eukitt.
Ergebniss: Polysaccharide, saure und neutrale.
Trennung zwischen sauren(blau bis violett)
von neutralen(rot) Mucopolysacchariden.

d) Astra-Blau-van Gieson:

(Haematoxylin-Pikrinsäure-Säurefuchsin nach van Gieson)
Entparaffinieren bis aqua dest.

Kernfärbung mit Weigerts Eisenhaematoxylin	3 Min.
Abspülen in Leitungswasser	ca 10 "
Astra-Blau-Lösung	10 "
wässern	10 "
5 %ige Ammoniummolybdatlösung	10 "
wässern	10 "
van Gieson-Gemisch	1 "

jetzt wird in 70 %igem Alkohol differenziert bis der grünliche Farbton der sauren Mucopolysaccharide wieder blau erscheint. 2 - 3 Min.
aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Eukitt
Ergebnis: Nach van Gieson kollagene Fasern rot, elastische gelb, retikuläre Fasern ungefärbt oder schwach rosa. Kerne braungelb. Durch Astrablau saure Mucopolysaccharide blau. Farbenmischung.

e) Toluidinblau bei verschiedenem pH.(3, 4, 6)

Entparaffinieren bis aqua dest.

Pufferlösung pH_x	2 Min.
$\frac{m}{250}$ Toluidinblaulösung pH_x	3 Std.
Pufferlösung pH_x	kurz

aufsteigende Reihe mit rascher Entwässerung,
Xylol, Eukitt.

Ergebnis: Ribo- und Desoxyribonucleinsäure blau.
Cytologische Details sind nicht immer klar zu differenzieren.

f) Methylenblau bei verschiedenem pH.(3, 4, 6)

Entparaffinieren bis aqua dest.

Pufferlösung pH_x	2 Min.
$\frac{m}{250}$ Methylenblaulösung pH_x	90 "
Pufferlösung pH_x	kurz
5 % ige Ammoniummolybdatlösung	5 Min.

aufsteigende Reihe mit rascher Entwässerung (10 Min.)
Xylol,Eukitt.

Ergebnis: Bei einer Methylenblaubindefähigkeit unter pH_4 wird das Vorliegen von Nucleinsäuren, sauren Mucopolysacchariden oder sauren Lipiden angenommen. Kurz: Starke Affinität bei pH_3 zu aktiven Zellen.

Lösungen bei der Einstellung auf ein bestimmtes pH:

Die Pufferlösungen wurden unter Verwendung von Citrat-Puffern: pH_3, pH_4, pH_6 der Fa. MERCK hergestellt.
(Puffer-Titrisole "MERCK")
Für die Farblösungen wurden 1,22 g Toluidinblau-Pulver, bzw. 1,3 g Methylenblau-Pulver (m/250) in dem jeweilig gewünschten pH-Puffer von 1.000,0 gelöst.

Nachtrag:

Durch eine lange Fixierung in nicht neutralisiertem Formalin wurden auch teilweise elastische und reticuläre Fasern bei der Astra-Blau-Färbung zur Darstellung gebracht.

C) ERGEBNISSE:

Bei der histologischen Untersuchung der gefärbten Serienschnitte stellte sich heraus, daß die Vielzahl der strahleninduzierten Hauttumoren histologisch hauptsächlich drei verschiedenen Gruppen zuzuordnen ist:
Die erste Gruppe besteht aus den verhornenden Plattenepithelcarcinomen mit typischer Hornperlenbildung, die von der Epidermis ihren Ausgang nehmen.
Nicht verhornende Plattenepithelcarcinome und Epitheliome mit unterschiedlichem Aufbau werden der zweiten Gruppe zugeordnet.
Die dritte Gruppe umfaßt die spindel- und polymorphzelligen Sarkome der Subkutis und Kutis.
Eine größere Anzahl der Schnitte zeigt zwar keine Tumoren, sondern nur Strahlenschäden und Proliferationserscheinungen mit teilweiser Entartung. Sie spielen bei der Untersuchung eine Rolle, da naturgemäß gerade die Übergänge zur malignen Entartung eine besondere Beachtung verdienen.
Wegen starker Nekrosenbildung konnte leider in einigen Fällen das Material nicht verwertet werden.
Histologische Einordnung:

Histologie	Anzahl
Nicht verhornendes Plattenepithelcarcinom	4
Verhornendes Plattenepithelcarcinom	4
Verwildertes Carcinom und Carcinom mit versch. Differenz.	3
Spindel- und polymorphzelliges Sarkom	8
Haut mit Strahlenschäden und Proliferationserscheinungen	9
Insgesamt	28

Bei der Bewertung der fassbaren Veränderungen sei berücksichtigt, daß es sich nicht um primäre Reaktionen auf die Strahlennoxe handelt, sondern um Folgeerscheinungen einer mangelnden Erstreaktion, die bei jeder Strahlenwirkung nach einer entsprechenden Latenzzeit auftreten. Die in der Perle enthaltene Energie kann "direkt" für den Zellstoffwechsel oder für die Reduplikationsfähigkeit der Zelle oder chromosomalen Strukturen wichtige Makromoleküle(zumeist Nukleinsäureketten) zerbrechen oder "indirekt" durch Erzeugung organischer oder anorganischer aus dem Zellwasser entstehender, chemisch äußerst aggressiver Radikale(Peroxyde etc.) wirken. Die Radikale ihrerseits können wieder Fermentsysteme blockieren oder auch die Synthese zellspezifischer Makromoleküle stören.
Mann nimmt heute an, daß diese indirekte Wirkung im Vordergrund steht. Wesentlich ist jedoch, daß bei allen Untersuchungen von der Wirkung am lebenden Objekt - dem Zellverband - ausgegangen wird, denn es ist nur zu verständlich, daß durch die biologische Pufferwirkung des lebenden Gewebes andere Ergebnisse gewonnen werden als bei der Untersuchung einzelner, aus dem Organismus gelöster Zellen. Trotzdem ist bei der Bewertung der Befunde zu bedenken, daß sowohl das histologische, als auch das histochemische Bild stets nur eine Phase eines Lebensablaufes ist, fixiert in einem toten Präparat.
Nach einer Bestrahlung von 8 Tagen hat sich um die Sr-90-Perle eine Kapsel gebildet, wie sie bei jedem Fremdkörper auch sonst auftritt. Diese Kapsel ist im Anfang faserreich, dazwischen sind spindellige Zellen mit Cytoplasmasaum, gelegentlich auch größere runde Zellen eingebettet.
Während zuerst auf das Trauma eine Leukocyteneinwanderung bemerkbar war, nimmt mit fortschreitender Liegezeit die Organisation des Kapselgewebes zu, das bald ein breites Lager zeigt.

Abb.: 1
Lupenübersichtsaufnahme eines Perlenbettes und der angrenzenden Haut.

S 812
ASTRA-PAS
90 x
B.D.: 630 Tage

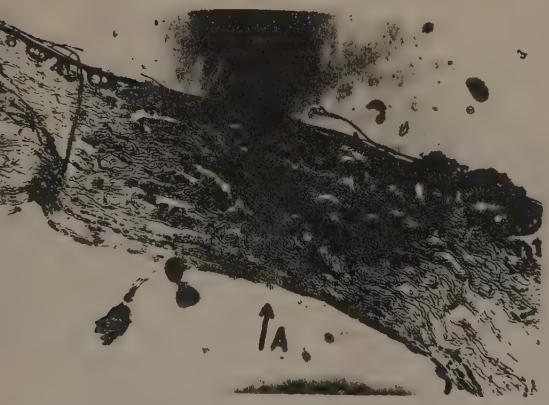

Abb.: 2
Umschließung der Perle -Pfeil A- durch junges Granulationsgewebe. Atrophie der Haut -Pfeil B-.

PAS mit Grünfilter
90 x
B.D.: 241 Tage
S 710

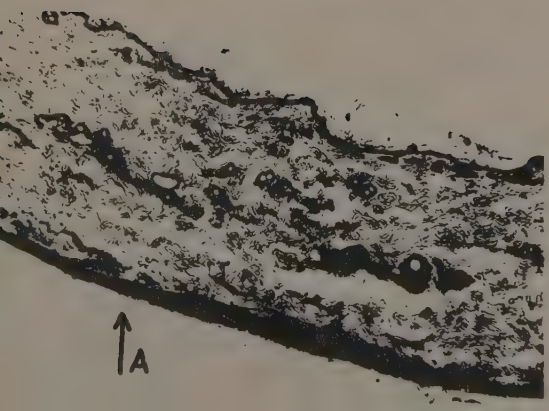

Abb.: 3
Zelluntergänge und Kernschäden im Bestrahlungsbereich.
Hyaline Kapsel-Pfeil A-.
Oedembildung.

S 710
ASTRA-PAS
Grünfilter
90 x
B.D.: 630 Tage

Die Kapillaren in der Kapsel enthalten sehr viele Erythrocyten. Der ursprüngliche Zellreichtum der Kapsel baut sich langsam wieder ab. Strahlenschäden waren noch nicht zu erkennen. Die Zellkerne waren mit der PAS-Färbung gut dargestellt. Es handelte sich demnach um ein typisches Organisationsgewebe.

Tabelle I - Strahlenschäden, Beginn maligner Entartung (?).

Färbungen	Fibroblasten Kern	Cytoplasma	Intercellulare Grundsubstanz	Reticulin
PAS	++	(+) auch -	+	hellrot
ASTRA	+	++	++ dunkelgrün bis blau	blaßgrün
ASTRA v.GIESON	++	(+)	++ blau	zart rot
METHYLENBLAU				
pH_3	-	-	-	
pH_4	(+)	-	-	
pH_6	++	+	+(+)	+
TOLUIDINBLAU				
pH_3	-	-	-	
pH_4	(+)	-	-	
pH_6	++	+	+(+)	+

Nach drei und mehr Monaten werden die ersten Strahlenschäden sichtbar: Die Epidermis wird atrophisch zu einem Saum, makroskopisch ist eine Alopezie erkennbar. Die Haarbälge halten sich verhältnismäßig lange. Es treten Kernpyknosen und Karyolysis auf. Die Kerne im Kapselgewebe werden strichförmig und nehmen deutlich in der Zahl ab. Das Cytoplasma färbt sich nicht mehr an, während die Kerne noch gut darstellbar sind. Das Fasergewebe erfährt eine zunehmende Quellung. Dieses Stadium der zellarmen Kapsel ist nur morphologisch fixierbar, es tritt zwar im Laufe der ersten Monate immer ein, bleibt aber auch - und das erscheint wichtig -

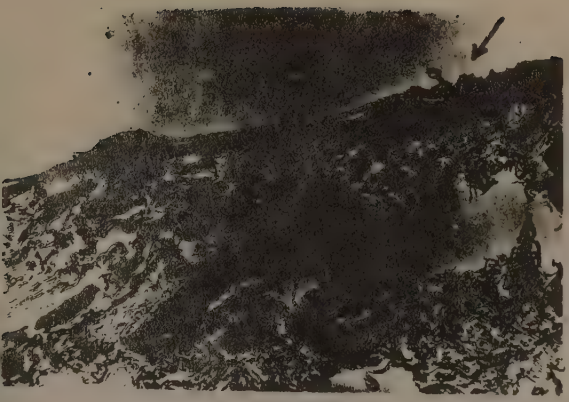

Abb.: 4

Umbau- und Proliferationserscheinungen in Haut und Anhängen(Pfeile). Zellaktivität.

S 812
PAS + Grünfilter
90 x
B.D.: 630 Tage

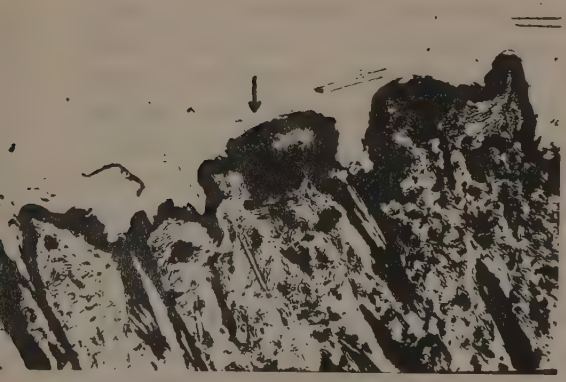

Abb.: 5

Die gleichen Erscheinungen wie bei Abb.: 4, stärkere Darstellung der proliferativen Vorgänge.

S 812
METHYLENBLAU pH_3
Grünfilter
B.D. 630 Tage

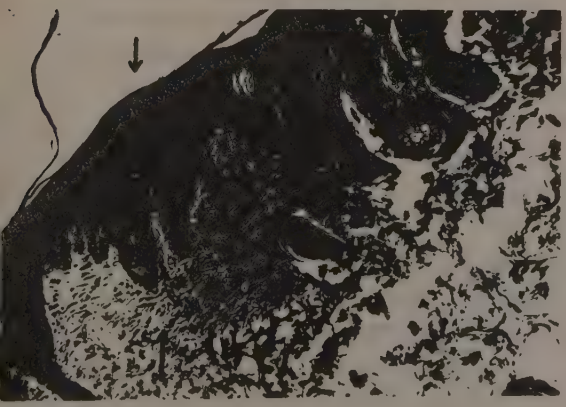

Abb.: 6

Vordringendes Plattenepithelcarcinom.(Pfeil A) Beginnende sarkomatöse Entartung des Bindegewebes.(Pfeil B)

S 251 a
ASTRA-PAS + Grünfilter
90 x
B.D.: etwa 80 Tage

in einigen Fällen bestehen.
Mit der Astra-PAS-Färbung ergiebt sich noch eine relativ gute Anfärbbarkeit, während bei der PAS-Färbung nur Kernreste und Gefäße darstellbar bleiben. Jedoch ist dies individuell verschieden und wahrscheinlich auch von der Perlenintensität abhängig.
Nach etwa 8 Monaten werden Umbauvorgänge in der Kapsel und in Kapselnähe sichtbar. Die Haut ist zunehmend atrophisch geworden. In unmittelbarer Nähe der Gefäße, aber auch um erhaltene Haarbälge ist oft ein auffallender Zellreichtum erkennbar. Bindegewebe ist nur spärlich vorhanden. Auch sind keine eigentlichen Zellen auszumachen, sondern oft nur ein polymorpher Kernhaufen, es scheint sich um Initialzellen zu handeln. Das Cytoplasma bildet einen schmalen Saum. Aus diesem "Bild" entsteht nach 1-3 Monaten in einigen Fällen ein deutliches Proliferationsstadium: Fibroblastisches Wachstum, Unordnung der Zellen, Polymorphie der Zellen.
Die Kerne zeigen die verschiedensten Formen: rund, oval, sichelförmig gelappt. Das Cytoplasma nimmt zu und bildet einen breiteren Randsaum, oft liegen die Kerne in großen, "leeren" Hüllen, einzeln und zu mehreren. Nebenbei sind Kernpyknosen und Untergänge zu beobachten. Mann gewinnt manchmal den Eindruck, als ob diese Proliferationsvorgänge in mäßiger Entfernung von der Perle gehäuft erscheinen.
Histochemisch sind noch keine größeren Veränderungen nachweisbar. Die Nukleinsäurefärbungen fallen etwas intensiver aus. Auffallend ist lediglich die Anfärbung einiger Bezirke mit der Methylenblaufärbung vom pH_3. Während "inaktives" Gewebe nach Alkoholdifferenzierung nahezu alle Farbe wieder verliert, bleiben die Zentren höherer Aktivität mehr oder weniger gefärbt. Es ergibt sich hieraus, daß dieses Gewebe eine Affinität zu dieser sauren Stufe des Farbstoffs haben muss, mit anderen Worten acidophil ist.
Das Cytoplasma erfährt hier erstmalig eine Anfärbung,

gelegentlich sind in der Nähe der etwas intensiver gefärbten Kernmembran im Cytoplasma kleine Einschlüsse erkennbar: die kleinsten haben gerade die Größe eines Kernkörperchens, die größten stellen Kugeln dar, die fast die Größe des ganzen Zelleibs einnehmen und so an Molluscumkörperchen erinnern. Es handelt sich wahrscheinlich um Glycoproteide.
Bei den bisher beschriebenen Vorgängen handelte es sich nur um Proliferationen ohne fassbare Malgnität.
Es wurde schon eingangs erwähnt, daß bei den Versuchen mit Perlen schwächerer Intensität nur selten ein Carcinom, sondern fast ausschließlich Sarkome auftraten.
Auch verstrich eine wesentlich längere Zeitspanne bis zum Erscheinen der Carcinome.
Hieraus lassen sich jedoch keine Schlüsse auf eine höhere Tumorlabilität des Bindegewebes schliessen.
Untersucht man in dem proliferierten Gewebe die einzelnen Kerne näher, so findet man gelegentlich PAS-positive und Methylenblau-pH_3-positive, schmale, spindelig ausgezogene Zellen, die praktisch kein Cytoplasma enthalten. Es war nicht möglich, diese "Stufe" bei anderen Präparaten weiter zu verfolgen. Waren nämlich regelrechte Sarkomzellen auszumachen, so fand sich auch stets ein infiltrierendes Wachstum und damit eine fassbare Malignität.
In einem Fall wurde in unmittelbarer Nähe der Perle in einem Epidermisbezirk stärkeres Wachstum des Platten - epithels beobachtet, das bereits in die tieferen Schichten vordrang. Es dürfte sich um einen Praecancer gehandelt haben, der durch die Strahlenwirkung "ausgelöst" wurde.
Bei einigen anderen Präparaten war die Epidermis schon fast völlig umgewandelt und drang massiv vor.
In zwei Fällen waren in dem darunter liegenden Bindegewebe sarkomatöse Gebiete klar zu erkennen.

TUMOREN:

Im Bereich des Strontium^{90}-Implantates kam es zur Entstehung von Sarkomen und Carcinomen.

Abb.: 7

Carcino-Sarkom

Wesentlich intensivere Anfärbung des carcinomatösen Gewebes.

S 836 a

METHYLENBLAU pH_6
Grünfilter
90 x
B.D.: 662 Tage

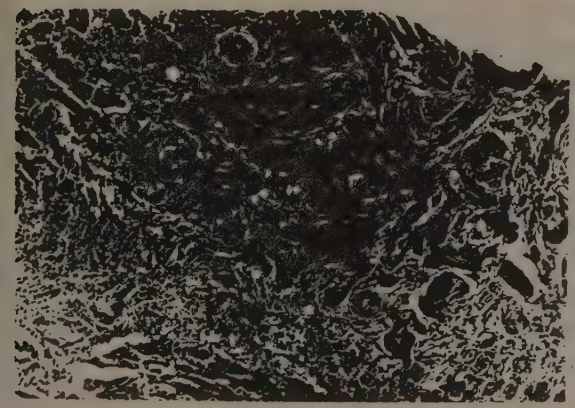

Abb.: 8

Verwildertes Plattenepithelcarcinom.

Bizarre Tumorzellen.

S 885 a

ASTRA-PAS + Grünfilter
90 x
B.D.: 754 Tage

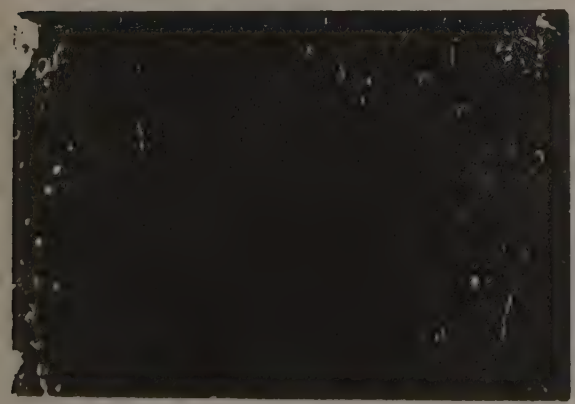

Abb.: 9

Verhornendes Plattenepithelcarcinom.

Verschiedene Stadien der Verhornung.

"Vogelaugenzellen:

S 878 a

ASTRA-PAS + Grünfilter
144 x
B.D.: 745 Tage

Auffallenderweise war das Resultat - dies sei ergänzend bemerkt - bei dem ersten Versuch mit Perlen höherer Intensität zugunsten der Carcinome ausgefallen, während beim zweiten Versuch in der Nähe der Perle eindeutig ein Überwie- von sarkomatösen Entartungen resultierte.
Bei den schwachen Perlen war es durch den Dosisabfall naturgemäß zu einer schwächeren Belastung der Epidermis gekommen. Die weit stärkeren Perlen des ersten Versuchs hatten schon makroskopisch erkennbare Hautschäden gesetzt. Man kann hieraus folgern, daß die Auslösung eines Carcinoms bzw. Sarkoms von der Stärke der Strahlenbelastung der betroffenen Gewebe abhängig ist.
Es wurde in einem Fall auch bei schwacher Perle schon früh ein Carcinom entdeckt, doch dies auffälligerweise in einem Bezirk, in dem die Perle in unmittelbarer Nähe der Epidermis implantiert war. Ob durch den schweren ulzerösen Strahlenschaden der stärkeren Perle eine fördernde Wirkung hinzu kommt sei dahingestellt.
Die verhornenden Plattenepithelcarcinome nehmen die größte Gruppe unter den Carcinomen ein. Es kam auch zur Bildung von nicht verhornenden Carcinomen, Carcinomen wechselnder Differnzierung und zu Carcino-Sarkomen.
Die Plattenepithelcarcinome gingen fast immer von der Epidermis aus. In wenigen Fällen waren jedoch auch einmal die Hautanhänge der Ursprungsort. Sie zeigten stets vordringendes Wachstum mit Proliferationszentren und Nekrosenbildung. Die Plattenepithelzapfen bildeten im Stroma konzentrisch geschichtete Hornmassen, so daß man den Eindruck eines "Abtropfens" bekam. Bei diesen perilokulären Verhornungen fand sich auf einigen Schnitten völlige Lösung vom Mutterboden.
Bei den Carcinomen wechselnder Differenzierung war oft ein "geregelter" Aufbau zu Strängen und Proliferationszügen auszumachen.

Abb.: 10

Verhornendes Plattenepithelcarcinom. Proliferationszentrum mit Mitosenreichtum.

S 878

METHYLENBLAU pH_3
90 x
Grünfilter
B.D.: 745 Tage

Abb.: 11

Spindelzellsarkom mit carcinomatöser Entartung des Epithels.(Pfeil) Starke PAS-Affinität der Carcinom- wie auch der Spindelzellen.

S 836 a

90x
PAS + Grünfilter
B.D.: 662 Tage

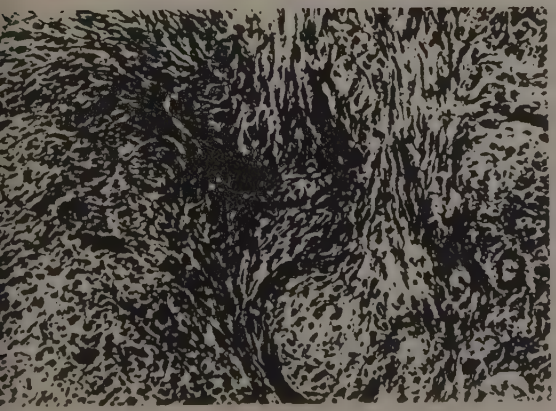

Abb.: 12

Proliferationszentrum eines Spindelzellsarkoms. Darstellung des vermehrten Gehalts an RNS + DNS im Tumorzentrum durch die Toluidinblaufärbung.

S 528 b

TOLUIDINBLAU pH_6
Grünfilter
B.D.: 492 Tage

Die Kerne waren sehr klein und zeigten Teilungsfiguren in allen Varianten. Auch waren Plasmavakuolen und acidophile Einschlüsse wechselnder Dichte vorhanden. Manchmal wurde der Eindruck erweckt, als hätten einige Bezirke innerhalb der Carcinome sarkomatösen Charakter angenommen - es kann sich natürlich auch um Carcinosarkome gehandelt haben.

SARKOME:

Die Sarkome hatten ihren Ursprung im subkutanen Bindegewebe. Sie waren oft in Kapselnähe, bzw. in der Kapsel selbst in ihren frühen Stadien gut erkennbar.
Die Mehrzahl dieser Tumoren bildete sich bei der schwächsten Perlenintensität. Sie zeigten den verschiedensten Aufbau und boten ein weit bunteres Bild als die Carcinome.
Es wurden spindelzellige, rundzellige, polymorphzellige und Carcino-Sarkome gefunden.
Bei sehr expansivem Wachstum entstanden oft mächtige Tumoren mit tiefen Ulzerationen, Kernanomalien und gehäuften Mitosen. Die Kapsel leistete dem Vordringen Widerstand.
Sehr oft waren die Perlen völlig in Tumormassen eingeschlossen.
In den nekrotischen Partien wurden keine regelrechten Kerne mehr angetroffen. Die Tumorrandgebiete enthielten besonders dicht gesetzte Kernreihen, die fächerförmige Wälle bildeten. Die Gefäßversorgung war deutlich vermehrt, die Lumina stark mit Erythrocyten gefüllt.
In einigen Fällen kamen carcinomatöse und sarkomatöse Elemente nebeneinander zur Beobachtung.
Der Gedanke war gegeben, daß einmal von einem epithelial bzw. ektodermal angelegten Gewebe ein Tumor ausgehen kann, der sarkomatösen Charakter trägt, oder eine Geschwulst, die in der Aneinanderfügung ihrer Zellen ohne Zwischensubstanz durchaus epithelialen Charakter aufweist.

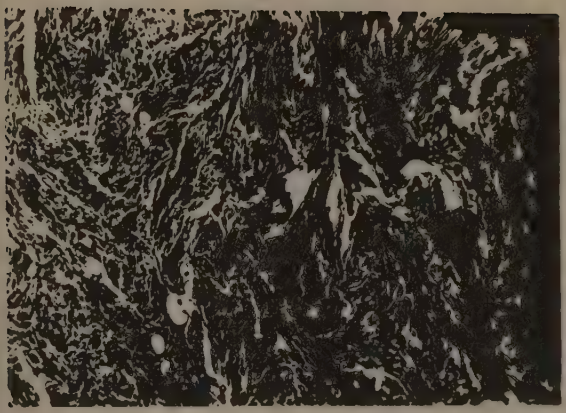

Abb.: 13

Myosarkom

Dieses Sarkom war in unmittelbarer Nähe der Perle entstanden. Ein Tumor war makroskopisch noch nicht vorhanden.

S 804 a

ASTRA-PAS + Grünfilter
90 x
B.D.: 589 Tage

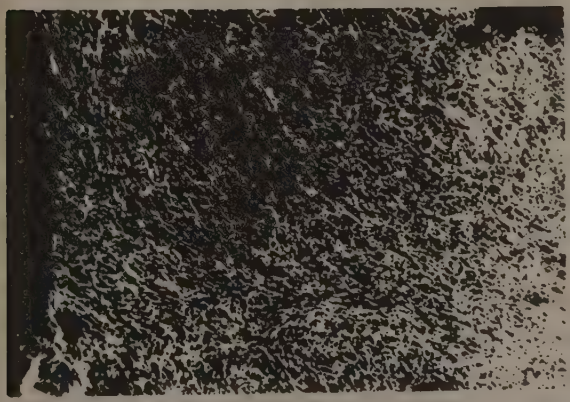

Abb.: 14

Polymorphzelliges Sarkom.

Infiltrierend wachsend. Kerndominanz. Riesenkerne.

S 822 a

ASTRA-PAS + Grünfilter
90 x
B.D.: 649 Tage

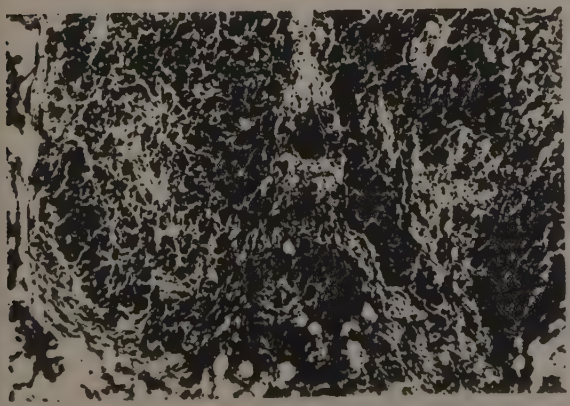

Abb.: 15

Rundzellsarkom

Tastbarer, kirschgroßer Tumor.
Kernhyperchromasie
Riesenkerne
Kernverklumpungen

S 531 b

ASTRA-PAS + Grünfilter
90 x
B.D.: 499 Tage

Histochemische Beobachtungen:

Es ist in der Überschrift absichtlich von "Beobachtungen" die Rede, denn diese Untersuchungen wollen keineswegs den Anspruch erheben, irgendwelche bindenden qualitativen, ja auch quantitativen "Ergebnisse" zu liefern.

Bei der Schilderung der Morphologie der Strahlenschäden und beginnenden Entartungen sind schon einige histochemische Beobachtungen wiedergegeben worden, zur Erweiterung sei noch einiges hinzugefügt.

Je nach Stärke des Strahlenschadens fand sich eine mehr oder minder starke - bzw. schwache Zellaktivität, die in spezifischen Färbungen manifest wurde.

Mit Methylenblau und Toluidinblau färben sich die Fibroblasten und Histiocytenkerne zu Beginn der Strahlennoxe noch genügend an. Das Cytoplasma zeigt dagegen schon eine deutliche Abblassung.

Die intercelluläre Grundsubstanz stellt sich im allgemeinen mit der PAS-Färbung und mit Astrablau gut dar. Es handelt sich den Färbungen gemäß um ein saures Glycoproteid.

Gelegentlich werden bei Methylenblaufärbung - wie der Toluidinblaustufe vom pH_6 leichte Metachromasie beobachtet.

Bei zunehmender Strahlenbelastung treten die Kerne immer mehr zurück, und die kollagenen Fasern beherrschen das Bild. Die Glycoproteid-Reaktionen fallen positiv aus, da das Kollagen viel Glycocoll enthält.

Die Zellkerne sind vorerst mit den Kernfärbungen gut auszumachen. Das Cytoplasma stellt sich dagegen nur sehr spärlich, manchmal überhaupt nicht dar.

Bei den auftretenden Hyperplasien und malignen "Vorstufen" sind die oft vergrößerten und polymorphen Zellkerne stark PAS-positiv. Auch die anderen Färbungen wie Methylenblau und Toluidinblau weisen Aktivität auf.

Das Cytoplasma zeigt eine zunehmende Anfärbung, was auf

einen erhöhten RNS-Gehalt zurückzuführen ist.
Auffallend war bei einigen stark aufgetriebenen Zellen in Hyperplasiebezirken die starke Anfärbung der Kernhülle mit der Toluidinblaufärbung vom pH_6, ebenfalls ein Hinweis auf den erhöhten RNS-Gehalt.
Bei den Carcinomen bot sich das in der folgenden Tabelle festgehaltene Bild:

Tabelle II - C a r c i n o m e

	Fibroblasten Kern - Cytoplasma	Intercellulare Grundsubstanz	Reticulin
PAS	+++ ++	+ bis ++	rosa
ASTRA	+ ++	++ blass grün-blau	blassgrün
ASTRA v.GIESON	++ +(+)	++ blassgrün	zart rosa
METHYLEN-BLAU			
pH_3	+ (+)	(+)	
pH_4	++ +	+	
pH_6	+++ ++	++	+
TOLUIDIN-BLAU			
pH_3	+ (+)	(+)	
pH_4	++ +	+	
pH_6	+++ ++	+(+)	+

Hervorzuheben war die starke ASTRA-Anfärbung in den Tumorzentren. In der Grundsubstanz fielen gelegentliche, sich mit der PAS-Färbung hellrot darstellende Partien auf.
Bei den nicht verhornenden Plattenepithelcarcinomen imponierte die scharfe Trennung von Kern und Cytoplasma bei der Methylenblau-pH_3-Stufe.
Bei den Sarkomen fand sich vor allem bei den Färbungen mit Astra-, Toluidin- und Methylenblau eine besonders intensive Anfärbung. Dies läßt auf einen vermehrten Gehalt an Nuklein-

säuren und sauren Mucopolysacchariden schließen. Die Anwesenheit von sauren Mucopolysacchariden wurde auch durch die Methylenblaufärbung vom pH_3 bestätigt, die hier schon deutlich positiv ausfiel und damit einen besonders spezifischen Nachweis lieferte.
Die Kerne zeigten hier die stärkste Affinität zur PAS-Färbung, ein Zeichen für den erhöhten Polysaccharidgehalt.
Die Einzelheiten sind wiederum in einer Tabelle festgehalten:

Tabelle III - S A R K O M E

	Fibroblasten Kern	- Cytoplasma	Intercellulare Grundsubstanz	Reticulin
PAS	+++	++	++ bis +++	rosa-rot
ASTRA	+++	++	+++ (Häufungen) (tief blau)	blaugrün
ASTRA-v.GIESON	+++	+	++ blau	rosa
METHYLEN-BLAU				
pH_3	++	++	+(+)	
pH_4	++	++(+)	++	
pH_6	+++	+++	+++ tief violett	
TOLUIDIN-BLAU				
pH_3	+	(+)	+	
pH_4	++	+(+)	++	
pH_6	+++	+++	+++ tief violett !	

D) DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde eine größere Zahl von Gewebsschnitten aus Bestrahlungszonen und dort entstandenen Geschwülsten untersucht. Es wurde versucht, morphologische und histochemische Veränderungen festzuhalten. Wenn es auch nicht möglich war, einen kontinuierlichen Weg vom ersten Anzeichen eines Strahlenschadens zum infiltrierend wachsenden Sarkom oder Carcinom zu finden, so sind doch sicher einige der vorliegenden Beobachtungen bemerkenswert, da sie einen Einblick in die formale Krebsentstehung innerhalb der Haut als Folge einer physikalischen Noxe ermöglichen.

Bei den "jüngsten" Schnitten war nichts weiter als die übliche Fremdkörperreaktion auf die implantierte Sr^{90}-Perle erkennbar: Junges Granulationsgewebe mit Ödembildung und Leukocyteninvasion, Hyperaemie der vermehrt erscheinenden Gefäße. Histochemisch unauffällig.

Nach längerer Bestrahlungsdauer werden Formation einer Kapsel, vereinzelte Kernschäden und Zelluntergänge beobachtet. Diese Kernschäden und Zelluntergänge nehmen bei längerer Bestrahlung zu. Histochemisch findet man ein Absinken der Zellaktivität. Die Eiweißsynthese ist deutlich gestört, das Cytoplasma färbt sich kaum noch an, die Kerne sind sehr klein und zeigen ein Absinken von DNS und RNS. Die Haut atrophiert zu einem schmalen Saum, in dem sich nur noch Kerntrümmer ausmachen lassen. Diese Vorgänge sind jedoch nicht immer generell, und deshalb war es auch nicht möglich, etwa von "Stadien" zu sprechen.

Bei längerer Bestrahlungsdauer wurden in einigen Fällen in der Epidermis, in den Gefäßwandschichten und in der Perlenkapsel verdächtige Zellen gefunden. Sie zeigten stärkere Variation der Zellform, Kerndominanz im Hinblick auf die Kernplasmarelation, Hyperchromasie der

Kernstruktur als Folge vermehrten Gehalts an RNS, Mitosen mit pathologischen Verformungen und Protoplasmaeinschlüsse mit Vakuolenbildung. Es dürfte sich mit ziemlicher Sicherheit um Malignitätskriterien dabei gehandelt haben. Die geschilderten Veränderungen wurden mehrmals aufgefunden und erhärteten vor allem, wenn sie in großer Zahl, ja verbandsweise auftraten, die Diagnose einer beginnenden malignen Entartung, eines PRÄCANCERS. Eine spezielle Färbung der malignen Zellen, wie sie von Papanicolaou beabsichtigt wurde, konnte bei den genannten Färbemethoden nicht beobachtet werden, wenn auch die besonders farbdichten Kerne und das oft polychromatische Protoplasma auffallend waren.
Es sei in diesem Zusammenhang auf die Worte FERGUSONS verwiesen(1949): " Veränderungen der Größe, Gestalt und Färbbarkeit des Zellkerns, wie sie gewöhnlich bei bösartigen Geschwülsten auftreten, können auch bei manchen Abnormitäten des Zellstoffwechsels, bei degenerativen und entzündlichen, reparativen Prozessen vorkommen."
Diese Tatsachen schwächen die Bedeutung, die man bisher den Kern- und Zellveränderungen bei der Krebsdiagnostik beigemessen hat, wesentlich ab: weder sind sie für sich allein als sicheres diagnostisches Merkmal zu verwenden, noch kann man sie in einer ursächlichen Beziehung zu Entstehung und Wachstum von Krebsen überhaupt bringen.
Wenn es auch nicht sicher zu beweisen war, daß bei den vorliegenden Versuchen und den entstehenden Zellveränderungen(frühe Veränderungen!) im Sinne eines Praecancers im weiteren Verlauf ein Carcinom bzw. Sarkom entsteht, so spricht doch die große Zahl der einwandfrei nachgewiesenen epithelialen und bindegewebigen Tumoren sehr dafür.
Interessant war unter anderem die Tatsache, daß oft innerhalb eines epithelialen Tumors auch spindelige Zellen zu

erkennen waren. Mit anderen Worten: der ursprünglich epitheliale Tumor hatte das Aussehen einer bindegewebigen Geschwulst angenommen.
Dies war schon von Hamperl(1938) in eigenen Untersuchungen an Carcinosarkomen beschrieben worden.
Es ist daher nicht ohne weiteres möglich, die Induktion von Epithel-Tumoren mit höheren Dosen, als sie zur Auslösung von Sarkomen notwendig waren, zu verstehen.
Es ist nicht zu klären, ob man den Grund darin finden kann, daß es durch den schalenförmigen Isodosenabfall zu einer weit geringeren Belastung der Epidermis kommt, oder ob es sich um ein weit komplexeres Geschehen handelt.
Durch die Strahlenbelastung des Gewebes kam es zu Atrophie der Haut nebst Anhängen, andererseits zu Hyper-plasie und Bildung von malignen Tumoren.
Man ist jedoch noch nicht in der Lage, die Vorgänge und Elementarprozesse, die ein Gewebe zu autonomenWachstum und damit zur Geschwulstbildung veranlassen, zu klären.
Histochemisch fand sich eine deutliche Vermehrung von RNS, DNS in den Kernen wie im Cytoplasma, mit anderen Worten, als erstes Zeichen einer beginnenden Hyperplasie/Malignität ein verstärkter Nukleinsäurestoffwechsel.
Die Zwischensubstanz enthält vermehrt Glycoproteide.
Dieses "Bild" kann auch als Abwehrphase auf die Strahlennoxe angesehen werden. Mit dem Auftreten von Variationen der Zellform, Verschiebung der Kernplasmarelation - Kerndominanz, Irregularitäten der Kernbegrenzung, Hyperchromasie des Kerninneren und Störungen des Protoplasmaaufbaues erkennt man das Bemühen der Zelle, den Zellstoffwechsel den erhöhten Anforderungen anzupassen.
Hierbei dürfte es zu einer unphysiologischen Hyperplasie kommen und mit der Zeit zu einer autonom wuchernden Geschwulst.

E) ZUSAMMENFASSUNG:

28 Gewebsstücke, die um subcutan implantierte Strontium^{90}-Perlen gelagert waren, sind in insgesamt etwa 2 000 Serienschnitten nach 10 Färbemethoden untersucht worden.
- Mit D. Hilweg waren es 17 verschiedene Färbungen.-

Es handelte sich spezifiziert um neun Hautbezirke mit Strahlenschäden, Hyperplasieerscheinungen bzw. beginnender Entartung, vier verhornende Plattenepithelcarcinome, drei verwilderte, bzw. verschieden differenzierte Carcinome und neun Spindel-, bzw. Polymorphzellsarkome.

Folgende Einzelheiten wurden zusammengefaßt beobachtet:

a) Stark strahlengeschädigte Haut mit Zelluntergang und völliger Atrophie. Histochemisch fand sich ein Fehlen jeglicher Zellaktivität.

b) Unphysiologische Hyperplasien mit Malignitätskriterien:
Variationen der Zellform, Auftreten von Riesenzellen, Verschiebung der Kernplasmarelation mit Kerndominanz, Störungen der Kerninnenstruktur mit Hyperchromasie, Nukleolenbildung, Mitosenreichtum und Sekretvakuolen innerhalb des Cytoplasmas.
Histochemisch fanden sich Anzeichen für einen verstärkten Nukleinsäurestoffwechsel: Vermehrung von D N S und R N S in den Kernen wie im Cytoplasma.
Die Zwischensubstanz wies einen erhöhten Glykoproteidgehalt auf.
Diese Veränderungen des Zellstoffwechsels wurden als Abwehrreaktion auf die ß-Strahlung gedeutet.

c) Sarkome

d) Carcinome

SCHLUSS: Durch den implantierten ß-Strahler Strontium^{90} kommt es nach einer physiologischen Fremdkörperreaktion

mit nachfolgender Kapselbildung entweder zu einer letalen Schädigung des umliegenden Gewebes mit völliger Atrophie oder zur Auslösung unphysiologischer Hyperplasien mit nachfolgender Entartung zu Sarkomen oder Carcinomen. -

F) Literaturangaben

1) BÜCHNER, Franz: Allgemeine Pathologie
Urban&Schwarzenberg, München-Berlin 1956

2) BAUER, K.H.: Das Krebsproblem, Springer 1949

3) DOMAGK, G.: Die experimentelle Geschwulstforschung,
Handbuch der Allgemeinen Pathologie Bd.II,
Teil I, Springer Verlag 1955

4) EKERT, Friedr.: Der Zelltod, Handbuch der Allgemeinen
Pathologie, Bd.II, Teil I, Springer V. 1955

5) EULER, H.v. und
Skarzynski, B.: Biochemie der Tumoren, Ferdinand Enke
Verlag, Stuttgart 1942

6) FLASKAMP, W.: Über die Röntgenschäden und Schäden durch
radioaktive Substanzen.
Bd.XII des Sonderbandes Strahlentherapie,
Urban & Schwarzenberg, 1958

7) GOMORI, George: Microscopic Histochemistry - Principles
and Practice, The University of Chicago,
press in 1952

8) KRAHL, P.: NIL NOCERE ! Carcinome als Spätfolge
nach Röntgenbestrahlungen gutartiger
Haut bzw. Lymphknotenerkrankungen.
MMW 43/60 - UK - HNO - Heidelberg

9) MAYER, E.G.: Krebsentstehung durch ionisierende
Strahlen.
14 und 9 in der MMW. Nr. 43/60

10) MERTEN, D. und
PRIBILLA, O.: Die Kontamination durch Radiostrontium.
MMW. Nr. 33/60

11) SCHUBERT, G.
mit B. FESER,
H.A.KÜNKEL,
L.OVERBECK und
G.UHLMANN: Tierexperimentelle Induktion maligner
Tumoren durch lokal wirksame ß=strahl. Isot

11) In: Wissenschaftliche Grundlagen des Strahlenschutzes. Braun, Karlsruhe 1957

12) PEARSE, A.G. Everson: Histochemistry - Theoretical and Applied.

13) RAJEWSKY, B.: Strahlendosis und Strahlenwirkung. Georg Thieme, Stuttgart, 1956

14) SEELENTAG, W.: Schädigung durch Röntgenstrahlen und durch Strahlung radioaktiver Stoffe.

15) WAMBERSIE, A., MAISIN, J., BRUCKER, J.M., CONSTANT, R.: Läsionen durch intracerebrale Iridium-194 Implantationen. In: Friedrich Ekert, Strahlendiagnostik und Strahlenschutz. 1960/II

=0=0=0=0=0=

Lebenslauf

Am 22.VIII.1931 wurde ich in Brake in Oldenburg als Sohn des praktischen Arztes Dr.med. Carl Reinecke und dessen Ehefrau Dr.jur. Margarethe Reinecke, geb. Bulle geboren.

In Brake besuchte ich die Schule und machte das Abitur. Mein Studium begann ich 1954 in Göttingen. Nach 2 Sem. ging ich nach Marburg/Lahn; hier bestand ich 1957 die ärztliche Vorprüfung.

Das klinische Studium absovierte ich ausschließlich in Hamburg. Im Juni 1960 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen.

Vom 6.Juli 60 bis zum 30.November 60 war ich auf der chir. Abteilung des Krankenhauses ELIM, Hamburg tätig.

Vom 1.Dezember 60 bis zum 15.April 61 habe ich in der Frauenklinik der Städt. Krankenanstalten, Bremen gearbeitet.

Seit dem 15.April bin ich auf der inneren Abteilung der Städt. Krankenanstalten, Oldenburg/Oldbg., Peter Friedrich Ludwig Hospital beschäftigt.

Oldenburg, den 30.Juni 1961